云 南 植 物 研 究 1988; 10 (3) : 280—284
Acta Botanica Yunnanica

# 向日葵幼胚培养中体细胞胚胎发生的观察

李映红 郭仲琛 王伏雄

（中国科学院植物研究所，北京）

**摘要** 1.向日葵不同品种体细胞胚胎发生的情况不同。2.较高浓度的蔗糖有利于向日葵幼胚的体细胞胚胎发生。3.在同样条件下，2 mm长的幼胚较其它时期的幼胚体细胞胚胎发生的频率高。4.在蔗糖浓度为17.5%并分别加入0.5—10.0ppm玉米素的Nitsch培养基中，向日葵幼胚产生体细胞胚胎发生的频率随着玉米素浓度的增高而增加。5．2，4-D能使体细胞胚胎发生，但不能分化器官。6.切片观察表明：在含玉米素的培养基上，幼胚产生了胚性细胞团和胚状体。并多数发生于子叶与下胚轴的深层。胚性细胞团周围细胞退化，使其与周围组织之间形成间隙。

**关键词** 向日葵；幼胚培养；玉米素；体细胞胚胎发生

近几年来植物体细胞胚胎发生的研究取得了很大进展。与器官发生相比体细胞胚胎发生在实际应用上更容易控制[1]，其机制的研究将对植物组织培养及细胞工程的实施有着重要的价值。但目前并非所有植物都能以胚状体途径产生植株[2]。因此，对向日葵在组织培养中胚胎发生的研究是很有意义的。

## 材 料 与 方 法

**材料** 向日葵（*Helianthus annuus* L.）。

**方法** 取向日葵花盘外围3—4圈的瘦果，无菌条件下取幼胚，尽快接种于培养基上。基本培养基为Nitsch或$B_5$，分别加入15—20%的蔗糖和不同浓度的玉米素或2，4-D。幼胚培养7天后开始固定，每两天一次。以Nawaschin作为固定液，酒精逐级脱水，二甲苯透明，石蜡包埋等常规方法。切片厚度为10—12μm。铁矾-苏木精染色。分别在解剖镜与显微镜下观察组织与细胞学形态变化并照像。

## 结 果 与 讨 论

### 1.品种间的差异

不同品种的向日葵心形期的幼胚接种于$B_5$基本培养基上，附加5 ppm的玉米素和16%的蔗糖。实验结果列入表1。

1987-07-06收稿

表1 品种间的差异

Table 1 Difference in the cultivars

| 品种 cultivars | 胚数 number of embryo | 培养20天后 after 20 days culture | | 培养30天后 after 30 days culture | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 产生胚状体数 No. of embryoids | % | 产生胚状体数 No. of embryoids | % |
| A | 122 | 0 | 0 | 19 | 15.6 |
| B | 160 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C | 183 | 16 | 8.7 | 17 | 9.3 |

其中品种A为采自农科院的80-4，罗-37，品种B为采自中科院遗传所6294和品种C为6305-22。幼胚接入培养基后30天，品种A有15.6%的幼胚出现胚胎发生现象，而B无胚胎发生现象。这种情况说明，不同基因型的向日葵幼胚在同样条件下具不同反应。基因型的差异在组织培养中是很普遍的。如Kuo（1986）对玉米花药的培养[3]和Raymod J. Mathias et al. 对小麦的研究都得到了类似的结果[4]。

**2.蔗糖浓度对体细胞胚胎发生的影响**

（1）不同蔗糖浓度的实验 在玉米素浓度为1.0ppm，蔗糖浓度分别为15%和20%的Nitsch培养基上，接种白葵杂一号早心形胚，连续观察30天。

在15%与20%的蔗糖浓度中，幼胚最初都进行胚性生长，但蔗糖浓度高的培养基中的胚明显比低浓度中的小，并且胚的子叶向下卷曲。

培养15天后，蔗糖浓度为20%培养基中的幼胚在解剖镜下观察可以发现胚体上有白色突起产生。石蜡切片观察表明，突起内含发育早期的胚状体。30天后，蔗糖浓度为15%时，有20%的胚产生胚状体；蔗糖浓度为20%时，为60%。这说明，在玉米素浓度一定的情况下，蔗糖浓度的高低与胚胎发生率是成正比的。这与Litz和Conover(1981)的研究结果相同[5]。

（2）不同时期幼胚的实验 不同时期的幼胚（球形胚、心形胚、2毫米长胚和8—10毫米长胚）接种在玉米素浓度为5.0ppm蔗糖浓度为16%的$B_5$培养基上。实验结果表明，其中只有2毫米长的幼胚经过培养后出现体细胞胚胎发生（45.8%的胚产生了胚状体）。说明16%的蔗糖浓度适合2mm长幼胚的胚胎发生。而前面的实验结果表明早心形胚在蔗糖浓度为20%时比浓度为15%时的胚胎发生频率高。由此可以推测，蔗糖浓度与不同时期幼胚的体细胞胚胎发生有一定的相关性：不同胚龄的幼胚组织其胚胎发生所需的最适蔗糖浓度各异。同时说明不同的蔗糖浓度对体细胞胚的发生起一定的控制作用。这并不排除2mm的幼胚较其它胚龄的幼胚更适合产生体细胞。凌定厚（1987）在籼稻的幼穗产生的愈伤组织培养中发现，高浓度的蔗糖有利于诱导体细胞胚胎发生，而低浓度的蔗糖则有利于维持胚性结构[6]。

**3.激素诱导体细胞胚胎发生**

（1）玉米素诱导胚胎发生 向日葵白葵杂一号心形胚接种在蔗糖浓度为17.5%并分别加入不同浓度玉米素的Nitsch培养基上。实验结果见表2。

表 2　玉米素浓度对胚培养中胚胎发生的影响

Table 2 Effect on somatic embryogenesis by different Zeatin concentrations in young embryo culture

| 玉米素浓度 concentration of Zeatin | 胚　数 No. fo embryos | 培养10天 after 10 days | | 培养20天 after 20 days | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | No. of embryos with embryoids | % | No. of embryos with embryoids | % |
| 0 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5 | 40 | 0 | 0 | 4 | 10 |
| 0.7 | 20 | 0 | 0 | 2 | 10 |
| 1.0 | 40 | 0 | 0 | 4 | 10 |
| 3.0 | 20 | 0 | 0 | 5 | 25 |
| 5.0 | 40 | 6 | 15 | 10 | 25 |
| 7.0 | 20 | 5 | 25 | 11 | 55 |
| 10.0 | 40 | 10 | 25 | 20 | 50 |

接种10天后，在解剖镜下观察，幼胚已产生了白色、表面光滑的突起，大多产生在子叶叶面和下胚轴上，子叶基部和背面也有发生。继续培养，白色突起形成各种胚状体（图版Ⅰ，6、7、9）。把带有胚状体的胚转移到含6%蔗糖的$B_5$培养基上，胚状体发育形成小苗。

随着玉米素浓度增高，产生体细胞胚的频率增加，如培养20天后，含玉米素5.0ppm的培养基中具有体细胞胚的幼胚为25%，而含玉米素10.0ppm的培养基中，有50%的幼胚发生了体细胞胚。

实验结果表明：作为细胞分裂素的玉米素完全可以单独对胚状体进行诱导，无需其它激素的参入。对这个问题有相反的两种报道，一些实验证明必须由生长素诱导胚胎发生[7，8，9]。而另一些实验证明只有细胞分裂素的存在也能诱导体细胞胚胎发生[10，11]。可以推断，不同植物体细胞胚胎发生所需的诱导物是不同的。

从石蜡切片观察中发现，胚状体既发生于胚体深层、子叶两表皮之间、下胚轴的中间；也发生于浅层、表皮以下或距表皮1—2层，大部分发生于胚的深层（图版Ⅰ，3、4）。由于所观察到的起动细胞和胚性细胞团周围均为非愈伤组织化的体细胞（图版Ⅰ，4）。因此胚状体的产生未经过愈伤组织阶段，直接由体细胞发生。

在切片中还观察到起动细胞与周围的细胞有明显区别，细胞质较浓厚，细胞核较大，有较厚的细胞壁与周围体细胞隔离（图版Ⅰ，1—3）。某些起动细胞不断分裂，形成具分生能力的胚性细胞团。胚性细胞团是胚状体产生的原基，胚状体在发育的过程中，它周围的细胞层退化解体，使胚状体与周围组织间形成缝隙（图版Ⅰ，4）。这表明胚状体在开始产生和发育中确实与周围组织保持相对的独立性。这种结构上的隔离是胚状体的原始细胞和细胞团与周围细胞在生理上隔离的必要条件，而生理上的隔离是其进行胚胎发生的先决条件[12]。但胚性细胞团不可能与周围组织在生理上完全隔离开。胚状体的发生和发育必须从周围组织中吸取营养和其它重要物质，因此观察中发现胚状体有类似胚柄的结构存在（图版Ⅰ，5）就不能忽视了。这种结构其细胞不象合子胚胚柄那样整齐，而成不规则排列。其很可能对胚体营养的需要起重要作用。Zee（1980）

在芹菜的体细胞胚发生中就观察到，内生胚状体顶部与周围组织有明显间隙，而胚柄部分几乎没有这样的缝隙[13]。

（2）2，4-D诱导胚胎发生　白葵杂一号幼胚接种在2，4-D浓度为0、0.5、1.0、2.0和4.0（ppm），蔗糖浓度为17.5%的Nitsch培养基上。

20天后，2，4-D的各个处理中都产生了在解剖镜下可以观察到的白色光滑突起。随着在原培养基上培养时间的延长，白色突起增多，直到两个月后停止。通过切片观察只见到白色突起表面向里2—4层细胞内包裹着细胞染色很深的胚性细胞团。虽然2，4-D不同浓度(0.5—4.0ppm)都能诱导胚性细胞团的产生，并且使胚性细胞团增生，但却无器官分化。这种结果与玉米花药和胡萝卜的培养工作一致[14]。Vasil在实验中也得出同样结论[15]。

## 参 考 文 献


1 Shoemaker R C, Couche L J, Galbraith D W. *Plant Cell Reports* 1986; 3:178—181

2 张世瑜，郑国锠. 植物学报 1986; 28:241—244

3 Bajaj T P S. Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 2, Crops I. Berlin: Springer-Verlag 1986; 168—180

4 Mathias R J, Simpson E S. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1986; 7:31—37

5 Litz R E, Conover R A. Z. *Pflanzenphysiol* 1981 A; 104:285—288

6 凌定厚，吉田昌一. 植物学报 1987; 29:1—8

7 朱澂. 遗传学报 1978; 5:79—88

8 Evans D A. Handbook of Plant Cell Culture Vol. I. New York: Macmillan Pub., 1983:82—123

9 Kamada H, Harada H. Z. *Pflanzenphysiol* 1976 A; 91:255—266

10 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京：人民教育出版社，1982:236—248

11 陈维伦，郭东红. 植物生理学报 1981; 7:83—84

12 Steward F C, Mapes M O, Mears K. *Amer. J. Bot.* 1958; 45:705—708

13 Zee S Y, Wu S C. *Aust. J. Bot.* 1980; 28:429—436

14 Padykula H A. Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes. London: Academic Pr., 1970:169—191

15 Vasil V, Vasil I K. *Amer. J.* Bot. 1982; 68:1441—1449


## 图 版 说 明

1.单核起动细胞，×320　2.双核起动细胞，×320　3.三个起动细胞，×320　4.胚性细胞团，×128　5.带有胚柄的球形胚状体，×128　6.发生于子叶上的心形胚状体。7.鱼雷形胚状体。8.从图9胚轴上取下的鱼雷形胚状体。9.发生于下胚轴上的鱼雷形胚状体。

## Explanation of Plate

1. A initiatic cell with the single nucleus. ×320　2. A initiatic cell with the double nuclei. ×320　3. Three initiatic cells. ×320　4. The group of embryonic cells. ×128　5. A globular embryoid with suspensor　6. A heart shaped embryoid which is produced on cotyledon.　7. A torpedo-shaped embryoid.　8. A torpedo-shaped embryoid taken from the hypocotyledonary axis of Fig. 9.　9. Torpedo-shaped embryoids which is produced on hypocotyledonary axis.

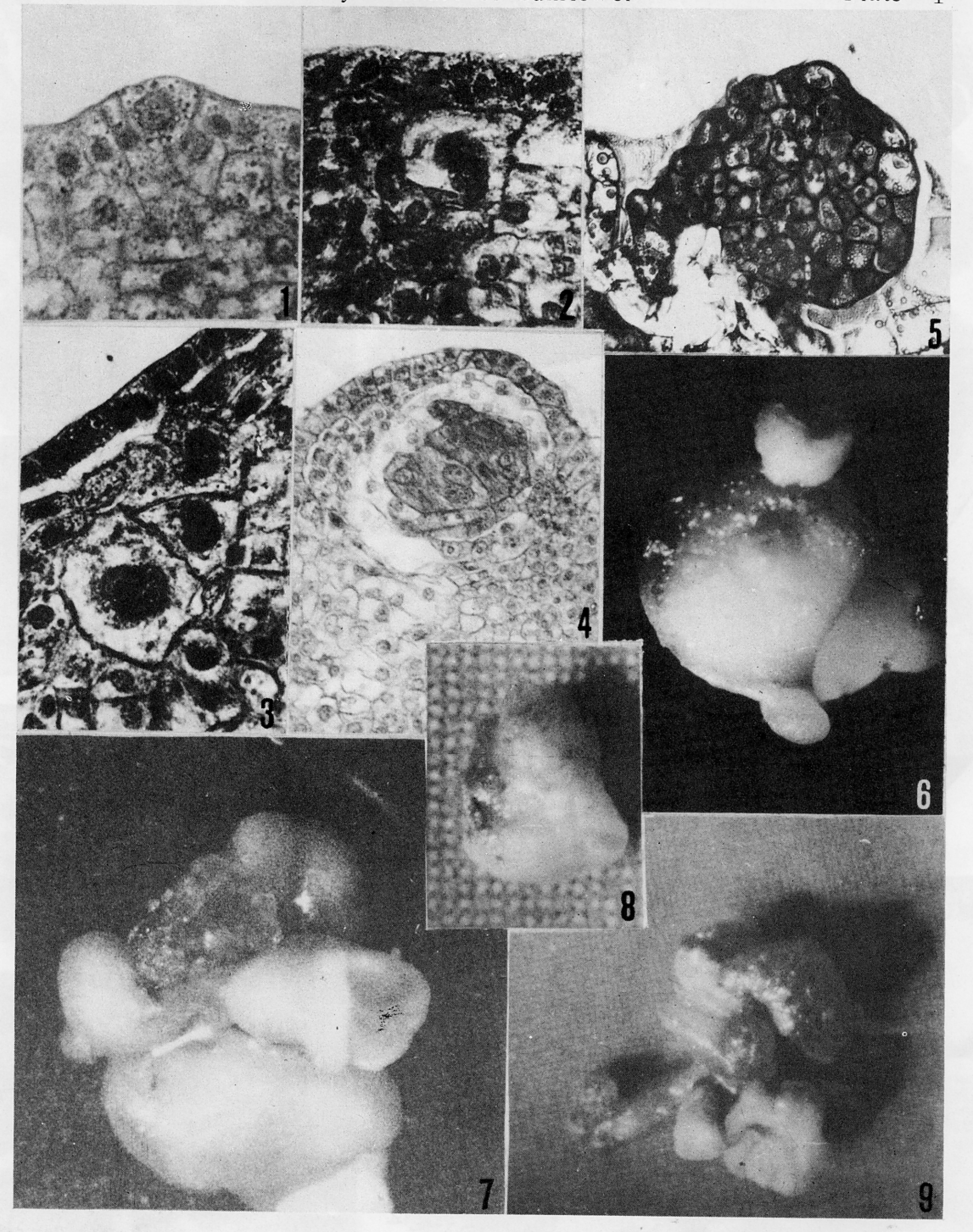
# OBSERVATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THE IMMATURE EMBRYO CULTURE OF SUNFLOWER

Li Yinghong, Guo Zhongshen, Wang Fuxiong

*(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)*

**Abstract** 1. The somatic embryogenesis is produced differently in the different cultivars of Sunflower. 2. The higher concentration of sucrose makes better somatic embryogenesis of Sunflower immature embryos. 3. The immature embryos of 2 mm length among the embryos of different size have the highest percentage somatic embryogenesis in the same condition. 4. The higher concentration of Zeatin is, the more percentage of somatic embryogenesis in Nitsch medium supplemented with 0.5—10.0ppm Zeatin and 17.5% sucrose in the immature embryo culture of Sunflower. 5. 2, 4-D makes the embryos somatic embryogenesis, but does not make them differentiation. 6. In the slides show, the immature embryos produce the embryonic cell groups and embryoids, many of which are emerged in the cotyledon and hypocotyledonary axis. The surrounding cells of the embryonic cell groups degenerate, such there is the space between the groups of cell and the surrounding tissue.

**Key words** Sunflower (*Helianthus auunns*); Immature embryo culture; Zeatin; Somatic embryogenesis


1
2
5
3
4
6
8
7
9